

No title available.

Patent Number: ☐ DE3716957

Publication date: 1988-12-01

Inventor(s): SCHUMACHER GUENTHER DR RER NAT (DE); JARSCH MICHAEL DR RER NAT (DE); BOOS WINFRIED PROF DR RER NAT (DE)

Applicant(s):: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ **WO8809373**

Application Number: DE19873716957 19870520

Priority Number (s): DE19873716957 19870520

IPC Classification: C12N15/00 ; C12P19/34 ; C07H21/04 ; C12N9/84

EC Classification: C07K14/255, C12N9/84, C12N15/74, C12N15/52, C12N15/62A

Equivalents: ☐ EP0316378 (WO8809373), B1, JP1501364T

Abstract

An expression vector for adjustable expression of exogenous genes in prokaryotes consists of a DNA vector which contains as the regulation sequence the promotor/operator region and the point of initiation of mgl-operon translation. To manufacture this type of expression vector, the desired parts of the mgl operon are cut out, by splitting with suitable restriction enzymes, from the genome of a cell capable of utilizing exogenous galactose, and then inserted in a suitable DNA vector.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12N 15/00, C12P 21/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 09373 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Dezember 1988 (01.12.88)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP88/00446 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1988 (19.05.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 16 957.2 (32) Prioritätsdatum: 20. Mai 1987 (20.05.87) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim (DE). (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SCHUMACHER, Günther [DE/DE]; Kapellenweg 20, D-8139 Bernried (DE). JARSCH, Michael [DE/DE]; Pollingerstrasse 16, D-8000 München 70 (DE). BOOS, Winfried [DE/ DE]; Feichengang 35, D-7750 Konstanz (DE).</p>		<p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Möhlstraße 22, D- 8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: EXPRESSION VECTOR FOR ADJUSTABLE EXPRESSION OF EXOGENOUS GENES IN PROKARYOTES (54) Bezeichnung: EXPRESSIONSVEKTOR ZUR REGULIERBAREN EXPRESSION VON FREMDGENEN IN PROKARYONTEN (57) Abstract An expression vector for adjustable expression of exogenous genes in prokaryotes consists of a DNA vector which contains as the regulation sequence the promotor/operator region and the point of initiation of mgl-operon translation. To manufacture this type of expression vector, the desired parts of the mgl operon are cut out, by splitting with suitable restriction enzymes, from the genome of a cell capable of utilizing exogenous galactose, and then inserted in a suitable DNA vector. (57) Zusammenfassung Ein Expressionsvektor zur regulierbaren Expression von Fremdgenen in Prokaryonten besteht aus einem DNA-Vektor, der als Regulationssequenz die Promoter/Operator-Region und die Initiationsstelle der Translation des mgl-Operons enthält. Zur Herstellung eines solchen Expressionsvektors inseriert man die gewünschten Teile des mgl-Operons, die aus dem Genom einer Zelle, die imstande ist, von außen zugeführte Galactose zu verwerten, durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten wird, in einen geeigneten DNA-Vektor.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Expressionsvektor zur regulierbaren Expression von
Fremdgenen in Prokaryonten

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft einen Expressionsvektor zur regulierbaren Expression von Fremdgenen in Prokaryonten.

Zur Expression von Proteinen in Prokaryonten benötigt man Expressionsvektoren. Derartige Vektoren müssen außer dem Gen des zu exprimierenden Proteins noch Regulationssequenzen enthalten, welche die Transkriptions- und Translationsprozesse in der zur Proteinproduktion verwendeten Zelle ermöglichen. Derartige Regulationssequenzen stammen - sofern in Prokaryonten exprimiert werden soll - aus Prokaryonten und enthalten beispielsweise Sequenzen von Promotoren, Operatoren und ribosomalen Bindungsstellen. Üblicherweise werden derartige Regulationssequenzen in einem Vektor, z. B. dem Plasmid pBR322 und dessen Derivaten, dem Gen vorgeschaltet. Diese Vektoren enthalten dann neben den vorher beschriebenen Regulationssequenzen auch noch einen Replikationsursprung und einen Marker zur Selektion des Plasmids, z. B. Tetrazyklinresistenz, Ampicillinresistenz, Canamycinresistenz und andere.

Die DNA-Einheit, die von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase erkannt und in Messenger-RNA übersetzt wird, bezeichnet man als Transkriptionseinheit. Eine solche Transkriptionseinheit besteht aus Erkennungssequenzen für die DNA-abhängige RNA-Polymerase, Erkennungssequenzen für die Initiation der ribosomen Funktion (Shine-Dalgarno-Sequenz), dem Startkodon ATG, einem Stopkodon und Terminationssequenzen, an denen die Transkription beendet wird. Bestimmte Gene, nämlich solche, deren

ERSATZBLATT

Genprodukte nicht im Cytoplasma lokalisiert bleiben, sondern in das Periplasma bzw. in die äußere Membran sekretiert werden, können daneben noch andere Erkennungssequenzen enthalten. Eine solche Erkennungssequenz zur Exkretion von Proteinen nennt man Signalsequenz. Eine Signalsequenz enthält charakteristische geladene Segmente, hydrophobe Bereiche und hydrophile Bereiche und eine Signalsequenz-Spaltstelle (siehe Übersichtsartikel Mechanismus of Protein Localisation, Microbiol. Reviews 1983, 47. Seite 314-344).

An einen Expressionsvektor werden demnach folgende Anforderungen gestellt:

- a) er muß einen starken Promotor enthalten,
- c) Fusionen mit Fremdgenen sollten leicht durchführbar sein und
- d) der Promotor incl. eines anschließenden Fremdgenabschnitts sollte geeignet sein, eine Lokalisation des Proteins sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma bzw. im Medium zu ermöglichen.

Es ist bekannt, daß der Umfang der Expression des Fremdgens wesentlich vom Promotor abhängt. Um zu beurteilen, ob ein bestimmter Promotor für die Expression von Fremdgenen besonders geeignet ist, kommt es allerdings nicht alleine auf die Menge des pro Zelle produzierten Fremdproteins an, sondern sehr oft ist es auch wünschenswert, daß das Genprodukt nicht während der gesamten Wachstumsphase, sondern nur über einen bestimmten Zeitraum - vorzugsweise der späten Wachstumsphase - synthetisiert wird. Dies ist vor allen Dingen bei der Expression von Genprodukten, die, wenn sie in großer Menge vorhanden sind, entweder für die Zellen

toxisch sind oder das Wachstum der Zellen hemmen, wünschenswert. Daher ist es oft erforderlich, die Aktivität eines Promotors zu Beginn der Fermentationsphase zu unterdrücken, so daß zunächst eine umfangreiche Biomasse produziert wird. Anschließend sollte durch geeignete Maßnahmen der Promotor stimuliert werden und die Expression des Fremdgens erfolgen können.

Zu diesem Zwecke bekannte Promotoren sind beispielsweise der lac-Promotor, der trp-Promotor und der λ -P_L-Promotor. Für eine großtechnische Produktion von heterologen Proteinen sind diese Promotoren jedoch nicht gut geeignet. Für den lac-Promotor ist bekannt, daß dieser durch Glucose abgeschaltet wird, jedoch nicht vollständig genug, um die Synthese von "toxischen" Proteinen zu verhindern. Auch der trp-Promotor ist kein für die großtechnische Produktion besonders gut geeigneter Promotor. Abgesehen davon, daß die Verwendung von hohen Tryptophankonzentrationen zur Repression die Fermentation wesentlich verteuert, hat sich gezeigt, daß Tryptophan keine vollständige Repression ermöglicht, so daß auch hier während der Anfangsphase der Fermentation eine störende Expression erfolgen kann. Auch der λ -P_L-Promotor ist für eine großtechnische Fermentation nicht geeignet. Der Repressionsmechanismus erfolgt hier durch die Bindung eines thermolabilen Repressors an einen hinter dem Promotor befindlichen Operator bei 32°C. Durch Temperaturerhöhung auf 42°C wird der Repressor inaktiviert, wodurch die Transkription ermöglicht wird. Für eine Großproduktion, welche mit Fermentationsvolumina von 50 oder 100 m³ verbunden ist, ist eine derartige Temperaturerhöhung mit großen Schwierigkeiten verbunden. Darüberhinaus hat

- 4 -

sich gezeigt, daß die Induktion des λ -P_L-Promotors in einer frühen Wachstumsphase erfolgen muß, so daß die für eine biotechnologische Großproduktion notwendige Biomasse nicht erreicht werden kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die vorstehend geschilderten Schwierigkeiten zu beseitigen und einen Expressionsvektor zur regulierbaren Expression von Fremdgenen in Prokaryonten bereitzustellen. Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch einen Expressionsvektor, der aus einem DNA-Vektor besteht, der als Regulationssequenz die Promotor/Operator-Region und die Initiationsstelle der Translation des mgl-Operons enthält. Dieser Expressionsvektor enthält wenigstens ein Fremdgen, das unter der Expressionskontrolle der mgl-Operon-Regulationssequenzen steht, wobei die Expression über den mgl-Promotor positiv oder negativ reguliert werden kann. Das Fremdgen kann aber auch erst später eingesetzt werden.

Der im erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthaltene mgl-Promotor ist ein Teil des mgl-Operons, welches neben dem Promotor noch 4 Strukturgene, mglA, mglB, mglE und mglC enthält, die der Kontrolle des mgl-Promotors unterliegen. Hierbei kodiert das mglB-Gen für ein Galactosidase-Bindungsprotein von 33.000 Dalton, mglA, mglC und mglE kodieren jeweils für membrangebundene Proteine. Vom mgl-Operon werden somit Proteine exprimiert, die für den Transport von Galactose aus dem Medium in die Bakterienzelle verantwortlich sind.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Vektors kann das mgl-Operon prinzipiell aus dem Genom einer Zelle, die in der Lage ist, von außen zugeführte Galactose zu verwerten, beispielsweise aus *Salmonella typhimurium*, DSM 554 oder aus *E. coli*, MC 4100 (DSM 4090) (J. Biol. Chem. 258 (1983) 10853-10855, J. Bacteriol. 153 (1983) 408-415) isoliert werden.

- 5 -

Die Isolierung des mgl-Operons aus *Salmonella typhimurium* kann erfindungsgemäß so erfolgen, daß die genomische DNA mit EcoRI gespalten und ein 6,3 kb großes Fragment isoliert wird, welches in üblicher Weise kloniert und anschließend exprimiert werden kann (vgl. hierzu J. Bacteriol. 163, 37-85, 1985, sowie die dort zitierte Literatur). Aus dem in dieser Literaturangabe zitierten Plasmid pNM 506 kann durch Spaltung mit EcoRI und BamHI ein ca. 900 bp großes Fragment herausgespalten und isoliert werden. Von der DNA-Sequenz dieses Fragments wurde unmittelbar nach der EcoRI-Erkennungssequenz beginnend die Sequenz bestimmt (Fig. 1). An Position 705 bis 707 befindet sich das Startkodon ATG. Fünf Nukleotide davor liegt die als Shine-Dalgarno-Sequenz erkennbare Nukleotidabfolge GGAG. Dieses Fragment enthält den mgl-Promotor, der jedoch nur einen Teil dieser DNA-Sequenz darstellt.

Im Gegensatz zu den bisher bekannten anderen Regulations-systemen kann der mgl-Promotor mit Glucose und anderen Katabolyt-reprimierenden Zuckern, wie z. B. Fructose oder Glucose-6-phosphat, nahezu vollständig reprimiert werden. Mit der erfindungsgemäßen Verwendung des mgl-Promotors ist es also möglich, auf besonders einfache Weise die Genexpression zu steuern. Beispielsweise kann bei der Fermentation Glucose als C-Quelle in bestimmter Menge zugegeben werden. Nachdem die Glucose aufgebraucht ist, beginnt die Expression, wobei dann eine andere C-Quelle zugesetzt werden muß, die nicht Katabolit-reprimierend wirkt (z. B. Glycerin oder Succinat). Durch zusätzliche Zugabe von Fucose kann die Promotoraktivität noch weiter gesteigert werden. Die Repression durch Glucose macht etwa einen Faktor 100 aus.

Der DNA-Vektor, der dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor zugrundeliegt, kann ein Plasmid, ein Phagengenom oder auch ein Shuttle-Vektor, der zur Expression in

- 6 -

grampositiven oder gramnegativen Bakterien, insbesondere in Enterobakterien, geeignet ist, sein. Als Expressionsvektoren sind die in den genannten Bakterien vermehrbaren Vektoren geeignet. Beispiele sind pBR-Vektoren wie pBR322, pUC-Vektoren wie pUC18 sowie die Phagen Lambda und M13 und ihre Derivate. Bevorzugt enthält der Expressionsvektor zur Insertion des zu exprimierenden Fremdgens einen Polylinker. Solch ein Polylinker wird nach bekannten Methoden hinter den Regulationssequenzen in den Vektor eingebaut. Vorzugsweise wird ein Polylinker verwendet, der eine oder mehrere Restriktionsschnittstellen enthält, die im verwendeten Plasmid oder im Phagengenom nicht oder selten vorkommen. Mit dem oder den entsprechenden Restriktionsenzymen wird der Vektor sodann geschnitten und das Fremdgen, welches entweder mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten ist oder dessen beide Enden in bekannter Weise so verändert wurden, daß sie ebenfalls zu der fraglichen Schnittstelle passen, einligiert.

Um die spätere Lokalisation des Genprodukts in der Wirtszelle von vorneherein zu bestimmen, kann zwischen die Regulationssequenzen und das Fremdgen die DNA-Sequenz für ein Signalpeptid zwischengeschaltet werden. Bevorzugt wird erfindungsgemäß die DNA-Sequenz für das Signalpeptid des mglB-Proteins, welches eine Lokalisation im Periplasma bewirkt, verwendet (J. Biol. Chem. 258 (1983) 10853-10855). An seiner Stelle kann aber auch die DNA-Sequenz einer anderen bekannten Signalsequenz oder einer Konsensussequenz (Nature 321 (1986), 706-708) verwendet werden. Solche Konsensussequenzen können durch Vergleich von bekannten Signalsequenzen untereinander ermittelt werden. Ohne Signalpeptid verbleibt das Fremdgenprodukt im Cytoplasma.

Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung enthält ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor vorzugsweise die Sequenz, welche in Fig. 1 dargestellt ist und den mgl-Promotor umfaßt, oder eine Sequenz, die bei Standardbedingungen damit hybridisiert. Dies kann auch eine im Vergleich zu der Sequenz der Fig. 1 verkürzte DNA-Sequenz sein, die aber noch den gesamten mgl-Promotor enthalten muß. Unter Standardbedingungen sind Hybridisierungsbedingungen zu verstehen, wie sie in T. Maniatis, Molecular Cloning CSH (1982) 383-389 beschrieben sind.

Das Expressionsprodukt eines anschließenden Fremdgens ist dann im Cytoplasma lokalisiert. Wird eine Exkretion ins Periplasma gewünscht, so wird gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform die mgl-B-Signalsequenz, die im unteren Teil der Fig. 1 dargestellt ist (Signalsequenz des mglB-Proteins) an die vorherige Sequenz angeschlossen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind die Plasmide M13mgl506 und M13mglEcoK, die eine ein ca. 900 bp EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pNM506 (Fig. 1) entsprechende DNA-Sequenz sowie im Falle von M13mglEcoK zusätzlich eine Polylinkersequenz (4x EcoK-Cassette, Nucleic Acids Research 13, (1985), 8561-71) insertiert in die doppelsträngige, replikative Form des Phagen M13mp18 (Sequenz in Gene 33 (1985), 103-119 beschrieben) enthalten. Erfindungsgemäß wird das Plasmid M13mgl506 hergestellt, indem man eine dem EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pNM506 entsprechende DNA-Sequenz in die ebenfalls mit EcoRI und BamHI geschnittene doppelsträngige replikative Form des Phagen M13mp18 einligiert. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des Plasmids M13mglEcoK beinhaltet das Einligieren

einer dem EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pNM506 entsprechenden DNA-Sequenz zusammen mit einer dem BamHI/EcoRI-Fragment aus dem Plasmid M13K11 entsprechenden DNA-Sequenz, die vier EcoK-Schnittstellen enthält (4x EcoK-Cassette, Nucleic Acids Research 13, (1985), 8561-71), welche die Durchführung einer Deletionsmutagenese erleichtert, bei der ein Fremdgen direkt hinter die Operonsequenz eingebracht werden kann (Methods Enzymol. 100 (1983), 468-500; Nucleic Acids Res. 10 (1982), 6487-6500) und als Polylinker zur Insertion eines beliebigen Fremdgens fungieren kann, in die mit EcoRI gespaltene replikative Form des Phagen M13mp18.

Die erfindungsgemäße Verwendung einer Regulationssequenz des mgl-Operons ermöglicht die durch Katalyt-reprimierende Zucker, wie z. B. Glucose, regulierbare Expression von Fremdgenen, wodurch es möglich wird, auch im großtechnischen Umfang sogar für die exprimierende Zelle toxische Genprodukte herzustellen, indem die Expression nur im späten Wachstumszyklus nach Entfernung oder Fermentation des Zuckers ermöglicht wird. Es ist dabei auch möglich, die spätere Lokalisation des Genprodukts im voraus zu bestimmen, wobei eine Lokalisation im Periplasma oder sogar Abgabe des Genprodukts ins Medium durch den oben erläuterten Aufbau des erfindungsgemäßen Expressionsvektor vorherbestimmt werden kann, z. B. durch Verwendung eines Prokaryonten, der Substanzen ins Medium abgeben kann, beispielsweise grampositive Bakterien oder E. coli Mutanten, wie sie z. B. in FEMS Microbiol. Lett. 51 (1979) 411-416 oder J. Bact. 145 (1981) 1351-1358 beschrieben sind. Dadurch wird die

Notwendigkeit eines Zellaufschlusses vermieden und ermöglicht, bei für die Wirtszelle nicht toxischen Genprodukten die Produktion fortlaufend weiterzuführen, wobei das Produkt laufend aus dem Medium gewonnen werden kann.

B e i s p i e l 1

Isolierung der mgl-Promotor-Operratorregion.

Aus dem Plasmid pNM506 (J. Bacteriol. 163 (1985), 37-45) wird durch Spaltung mit EcoRI und BamHI ein 897 Basenpaar großes Fragment gewonnen (Fig. 1).

Dieses Fragment enthält die Promotor-Operator-Region des mgl-Operons. Es wird in die doppelsträngige replikative Form des Phagen M13mp18 (Sequenz vgl. Gene 33 (1985) 103-119), die ebenfalls mit EcoRI und BamHI gespalten wurde mit Hilfe von T4 DNA-Ligase einligiert (Fig. 2). Das entstehende Plasmid trägt die Bezeichnung M13mgl506.

In analoger Weise wird ein gleichwertiges Plasmid hergestellt, in dem das Plasmid pUC18 (Fig. 7) ebenfalls mit EcoRI und BamHI geschnitten wird und dort das genannte Fragment eingesetzt wird (Fig. 3).

Diese beiden Vektoren dienen als Quelle für das DNA-Fragment mit mgl-Promotor und gegebenenfalls zusätzlich mit mgl-B-Signalsequenz zur Konstruktion von Vektoren die unter Kontrolle des mgl-Promotors Fremdgene exprimieren können.

- 10 -

B e i s p i e l 2

Konstruktion eines Universal-Vektors mit mgl-Promotor, in den Fremdgene eingebaut werden können.

Ein DNA-Fragment aus M13K11, das vier EcoK-Schnittstellen und an den Enden eine BamHI- und eine EcoRI-Schnittstelle trägt (4x EcoK-Cassette) (beschrieben in Nucleic Acids Research 13, (1985), 8561-71) wird zusammen mit dem EcoRI, BamHI-Fragment aus pNM506 (Beispiel 1) in einen mit EcoRI gespaltenen Vektor M13mpl8 ligiert. Hierbei entsteht der Vektor M13mglEcoK (Fig. 4). Dieser Vektor besitzt eine Polylinkerregion mit den Schnittstellen KpnI, SacI, HindIII, SphI, PstI, SalI und XbaI, in die beliebige Fremdgene eingesetzt werden können.

B e i s p i e l 3

Vektor zur Expression von Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H)

Der durch die Schnittstellen EcoRI und SalI definierte N-terminale Teil des Endo H-Gens (Fig. 8, Länge 609 bp) (Journal of Biological Chemistry 259, (1984) 7577-7583) wird aus dem Plasmid pEH 7' isoliert.

Das aus M13mgl506 (Beispiel 1) durch Schnitt mit BamHI und SalI erhaltene Fragment, das oben beschriebene EcoRI-SalI-Fragment sowie die in Beispiel 2 beschriebene 4x EcoK-Cassette (als EcoRI-BamHI-Fragment) werden mit T4 Ligase ligiert, wobei die Konstruktion gemäß Fig. 5 entsteht.

Durch in vitro Mutagenese (Methods Enzymol 100 (1983), 468-500; Nucleic Acids Res. 10 (1982), 6487-6500) mit einem synthetischen Oligonukleotid der Sequenz

5' CCCCTGCTTC ACCGGGGCCA TGGTAGCTCC GGTTTT 3'

erhält man eine Fusion zwischen dem ATG des mgl-Promotors und dem N-terminalen Teil des reifen EndoH-Gens. Hierbei ist weder eine Signalsequenz von mgl noch von EndoH enthalten. Die Klone, welche die gewünschte Deletion enthalten, werden über ein Screening mit dem oben beschriebenen radioaktiv markierten Oligonukleotid als Probe identifiziert. Von einem der durch dieses Screening identifizierten Klone wird die replikative DNA präpariert.

Diese DNA wird mit EcoRI und SphI gespalten. Das hierbei entstehende Fragment (750 Basenpaare) wird mit einem SphI-BamHI-Fragment, welches den Rest des EndoH-Gens von SphI bis über das Ende des Gens (J. Biol. Chem. 259 (1984) 7577-7583) enthält, in einen mit EcoRI und BamHI gespaltenen PUC13-Vektor (Sequenz Fig. 9), ligiert. Hierbei entsteht ein Vektor, der das mgl-Promotor-Gen sowie das vollständige Gen von EndoH trägt (Fig. 6). Dieser Vektor wird mit pBT0103, bezeichnet.

Mit Hilfe dieses Plasmids kann Endoglycosidase H in E. coli HB101, DSM 1607, exprimiert werden. Die Expression läßt sich durch Zugabe von Glucose steuern.

- 42 -

T a b e l l e I

Anzucht von E. coli HB101 mit Plasmid pBT0103 in LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro Liter) mit und ohne Glucose.

Glucose		Aktivität EndoH (U/l Medium)
0	%	ca. 100
0,1	%	ca. 10
0,2	%	0
0,4	%	0

Analoge Ergebnisse werden erhalten, wenn anstelle von Glucose Glucose-6-phosphat verwendet wird.

B e i s p i e l 4

Vektor mit mgl-Promotor, mgl-Signalsequenz und Endo H-Gen

Das Plasmid pBT0103 (Beispiel 3) wird mit NcoI geschnitten und ein synthetischer Linker, der für das mgl-Signalpeptid kodiert (Fig. 1, Pos. 688-756) durch Ligation eingefügt, so daß ein korrektes Leseraster, sowie korrekte Prozessierung gewährleistet ist.

B e i s p i e l 5

Vektor mit mgl-Promotor und β -Galactosidase-Gen ohne Signalsequenz.

- 13 -

Das Plasmid pBT0103 (Beispiel 3) wird mit NcoI/PstI gespalten und das hierbei entstehende 3,3 kb große Fragment isoliert.

Ein BamHI/PstI-Fragment von ca. 5 kb des Plasmids pBT 117, DSM 3063 (beschrieben in EP 0 180 225 A2), welches den größten Teil des lacZ-Gens enthält, wird präpariert und unter Verwendung eines synthetischen Linkers der Sequenz

```

5' C ATG GTT ACG GAT TGC TGC AGG TCG ACG      3'
    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||
3'      CAA TGC CTA ACG ACG TCC AGC TGC CTA G 5'
      NcoI              PstI      SalI      BamHI

```

mit dem 3,3 kb-Fragment ligiert, wobei ein Plasmid erhalten wird, bei dem der Leserahmen des lacZ an das ATG des mgl-Gens fusioniert ist (pPZ07-mgllac, Fig. 10). Bei Einbringen dieses Plasmids in E. coli HB101, DSM 1607, wird eine Expression von β -Galactosidase in die cytoplasmatische Fraktion der Zelle beobachtet, die Glucose-steuerbar ist (Tabelle II).

Tabelle II

Stamm:	β -Galactosidase-Aktivität:	
	LB-Medium	LB-Medium + 0,2 % Glucose
HB101	4900	4700
HB101 x pPZ07-mgllac	31400	1700

- 14 -

(Die β -Galactosidase-Aktivitätsbestimmung wurde wie bei J.H. Miller (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York beschrieben durchgeführt.)

Beispiel 6

Expression der Pen-G-Amidase

Das mgl-Expressionsplasmid wurde verwendet, um das periplasmatische Enzym Penicillin G-Amidase zu exprimieren. Die Subklonierung und die DNA-Sequenz der Pen-G-Amidase sind in EP 0180225 A2 beschrieben. Die replikative Form des Phagen M13mgl506 (Beispiel 1) wurde mit HindIII und BamHI gespalten. Die HindIII-Schnittstelle wurde vor der Spaltung mit BamHI mit Polymerase I (Klenow-Fragment) und den 4 Desoxyribonukleotidtriphosphaten glatt gemacht.

Aus dem Plasmid pBT212, DSM3058 (beschrieben in EP 0 180 225 A2), wurde durch Spaltung mit BamHI und AhaIII ein Fragment von ca. 800 bp isoliert. Dieses Fragment wird in den vorher beschriebenen und mit BamHI und HindIII geöffneten Vektor M13mgl506 ligiert. Unter Verwendung des Oligonukleotids

5' ACTTGACGACTGCTCCGCGTGCGCGTGCGC 3'

und der einzelsträngigen DNA des Phagen M13 kann nun eine Deletionsmutagenese durchgeführt werden. Einzelheiten dieser Methode sind im Handbuch "Oligonukleotid-directed in vitro mutagenesis system" Amersham rpn 2322 beschrieben. Durch die Deletion entsteht eine exakte Fusion zwischen der mgl-Signalsequenz und dem Gen der

Pen-G-Amidase in der Art, daß in dem Protein, welches aus der DNA übersetzt wird, Aminosäure 23 des mgl-Signalpeptids (Fig. 1) mit Aminosäure 27 der Pen-G-Amidase fusioniert ist. Die Klone, welche die gewünschte Deletion enthalten, werden über ein Screening mit dem oben beschriebenen, radioaktiv markierten Oligonukleotid als Probe identifiziert (vgl. Handbuch loc. cit). Von einem der durch das Screening identifizierten Klone wird die replikative DNA präpariert (vgl. Handbook loc. cit. dort M13 cloning and sequencing).

Die DNA wird mit EcoRI und EcoRV gespalten und das ca. 1 kb große DNA-Fragment isoliert. Dieses DNA-Fragment wird in den mit EcoRI und EcoRV gespaltenen Vektor pBT212 ligiert und damit die kodierende Region der Pen-G-Amidase unter die Regulationskontrolle des mgl-Promotors gebracht.

B e i s p i e l 7

Expression und Sekretion Penicillin G Amidase (PenG)
über mgl-Promotor und mgl-Signalpeptid

Das Plasmid pBTE1-11 (EP 0180225 A2, DSM 3061) enthält das PenG-Gen. Durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen ClaI und SphI kann ein 182 bp großes DNA-Fragment erhalten werden, das den N-terminalen Bereich des PenG-Gens einschließlich des Starts der reifen PenG umfaßt. Dieses Fragment wird in AccI-SphI gespaltenen Vektor M13mglEcoK (Fig. 4) einligiert. Durch In-vitro-Mutagenese, wie in Beispiel 3 beschrieben, mit einem synthetischen Oligonukleotid der Sequenz:

1 ACTTGACGAC TGCTCCGCGT GCGCGTG 27

erhält man eine Fusion zwischen dem Ende der mglB-Signalsequenz und dem Start der reifen PenG. Die für das Signalpeptid der PenG kodierende Sequenz fehlt. Die Klone, welche die gewünschte Deletion enthalten, werden über ein Screening mit dem oben beschriebenen radioaktiv markierten Oligonukleotid als Hybridisierungssonde identifiziert. Von einem dieser Klone wird replikative, doppelsträngige DNA präpariert.

Diese DNA wird mit EcoRI und SphI gespalten. Das entstehende DNA-Fragment (812 bp) wird in EcoRI und SphI gespaltenes Vektorplasmid pUC18 einligiert. Nach Transformation von E.coli HB101 wird aus einem korrekten Klon Plasmid-DNA präpariert. Diese DNA wird mit SphI und HindIII gespalten und mit einem DNA-Fragment von 3000 bp Größe ligiert, das aus pBTE1-11 durch Spaltung mit SphI und HindIII gewonnen wurde und den fehlenden C-terminalen Bereich des PenG-Gens enthält.

Das dabei entstehende Plasmid, pPZ07-mglpenG (Fig. 11) enthält den für die reife PenG kodierenden Genabschnitt fusioniert an die mglB-Signalsequenz. Die Expression dieses Fusionsgens wird über den mgl-Promotor gesteuert und ist glukoseabhängig (Tabelle III). Exprimierte PenG wird über das mglB-Signalpeptid in den periplasmatischen Raum ausgeschleust und dort zum aktiven Enzym prozessiert.

Tabelle III:

Stamm:	PenG Aktivität (mU/A 420 Zelldichte):	
	LB-Medium	LB-Medium + 0,4% Glucose
HB101 x pUC18	0	n.b.
HB101 x pPZ07-mglpenG	20,9	0,8
HB101 x pBT E1-11	1,7	n.b.

(Die PenG-Enzymaktivität wurde mit 2-Nitro-5-phenylacetaminophenylelessigsäure als Farbsubstrat, wie bei Kutzbach, C. und Rauenbusch, E. (1974), Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. Bd. 354, 45-53 beschrieben, bestimmt.)

Zur Entfernung des in Plasmid pBT212 vorhandenen tac Promotors wird das Plasmid mit BamHI und EcoRI gespalten, die Enden mit DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) und den 4 Desoxyribonukleotidphosphaten glatt gemacht und religiert.

Die Expression der Pen-G-Amidase unterliegt in diesem Plasmid der Katabolit-reprimierbaren Kontrolle und wird mit Hilfe der mgl-B-Signalsequenz in das Periplasma ausgeschleust.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Expressionsvektor zur regulierbaren Expression von Fremdgenen in Prokaryonten, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß er aus
einem DNA-Vektor besteht, der als Regulationsse-
quenz die Promotor/Operator-Region und die Initia-
tionsstelle der Translation des mgl-Operon ent-
hält.
2. Expressionsvektor nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß er wenigstens ein Fremdgen enthält, welches
unter der Expressionskontrolle der mgl-Operon-Regu-
lationssequenz steht.
3. Expressionsvektor nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß der DNA-
Vektor ein Plasmid oder ein Phagengenom ist.
4. Expressionsvektor nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß der DNA-
Vektor ein Shuttle-Vektor ist, der für grampositive
sowie gramnegative Bakterien geeignet ist.
5. Expressionsvektor nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß er einen
Polylinker enthält, in den das Fremdgen insertiert
vorliegt.

6. Expressionsvektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß er zwischen der regulatorischen mgl-Operonteilsequenz und dem Fremdgen bzw. dem Polylinker eine Signalsequenz enthält, die die räumliche Lokalisation des exprimierten Genprodukts in der Wirtszelle bestimmt.
7. Expressionsvektor nach Anspruch 6, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Signalsequenz aus der für das Signalpeptid des mgl-B-Proteins kodierenden Sequenz besteht.
8. Expressionsvektor nach Anspruch 6, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die mgl-B-Signalsequenz durch eine Konsensussequenz von Signalpeptiden ersetzt ist.
9. Expressionsvektor nach den Ansprüchen 1 bis 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß er die Nukleotide 1 bis 704 der DNA-Sequenz, die in Fig. 1 dargestellt ist, enthält, oder eine Sequenz, die bei Standardbedingungen damit hybridisiert.
10. Expressionsvektor nach den Ansprüchen 6 bis 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß er die Nukleotide 1 bis 775 der DNA-Sequenz, die in Fig. 1 dargestellt ist, enthält, oder eine Sequenz, die bei Standardbedingungen damit hybridisiert.
11. Plasmid M13mgl506.

12. Plasmid M13mglEcoK.
13. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewünschten Teile des mgl-Operons aus dem Genom einer Zelle, die imstande ist, von außen zugeführte Galactose zu verwerten, durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen herausschneidet und diese in einen geeigneten DNA-Vektor insertiert.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewünschten Teile des mgl-Operons aus dem Genom von *Salmonella typhimurium*, DSM 554 oder aus *E. coli*, DSM 4090 herausschneidet.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man eine DNA-Sequenz, die dem Teil des mgl-Operons aus dem Plasmid pNM506, wie in Fig. 1 dargestellt, entspricht, in einen geeigneten Vektor insertiert.
16. Verfahren nach Anspruch 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als DNA-Vektor die replikative Form des Phagen M13mpl8 oder einen pUC-Vektor verwendet.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich noch hinter die mgl-Sequenzen einen Polylinker insertiert.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine DNA-Sequenz verwendet, die der in
Fig. 1 dargestellten Sequenz des Plasmids pNM506
entspricht, welche außer den mgl-Operon-Regula-
tionssequenzen auch die für die Signalsequenz des
mgl-B-Proteins codierende Sequenz enthält.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man hinter die mgl-Operonteilsequenz eine
für eine Signalsequenz kodierende DNA-Sequenz
insertiert.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man hinter die mgl-Operonsequenz eine für eine
Konsensus-Sequenz von Signalpeptiden kodierende
DNA-Sequenz insertiert.
21. Verfahren zur Herstellung des Plasmids M13mgl506,
nach Anspruch 18, dadurch
gekennzeichnet, daß man eine
dem EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pNM506
(Fig.1) entsprechende DNA-Sequenz in die ebenfalls
mit EcoRI und BamHI gespaltene doppelsträngige
replikative Form des Phagen M13mp18 einligiert.
22. Verfahren zur Herstellung des Plasmids M13mglEcoK
nach Anspruch 18, dadurch
gekennzeichnet, daß man eine
dem BamHI/EcoRI-Fragment des Plasmids M13K11 ent-
sprechende DNA-Sequenz, die vier EcoK Schnitt-
stellen enthält (4x EcoK-Cassette) zusammen mit

- 22 -

einer dem EcoRI/BamHI-Fragment des Plasmids pNM506 (Fig. 1) entsprechenden DNA-Sequenz in die mit EcoRI gespaltene replikative Form des Phagen M13mp18 einligiert.

23. Verwendung eines Expressionsvektors nach den Ansprüchen 1 bis 12 zur regulierbaren Expression eines Fremdgens in Prokaryonten unter der Expressionskontrolle des mgl-Promotors.
24. Verwendung eines Expressionsvektors nach den Ansprüchen 6 bis 12, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die gewünschte Lokalisation des entstandenen Genprodukts in der Zelle durch eine Signalsequenz bestimmt wird.
25. Verwendung eines Expressionsvektors nach den Ansprüchen 1 bis 12 gemäß Anspruch 23 und 24, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Expression des Fremdgens über den Gehalt an Katalyt-reprimierenden Zuckern im Medium reguliert wird.
26. Verwendung nach den Ansprüchen 13 bis 25, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß zur Expression ein Prokaryont verwendet wird, der das hergestellte Genprodukt aus dem Periplasma ins Medium abgeben kann.

Fig. 1

Sequenz des EcoRI/BamHI-Fragments aus pNM506 mit dem mgl-Promotor und der mgl-B-Signalsequenz (DNA und Aminosäuresequenz)

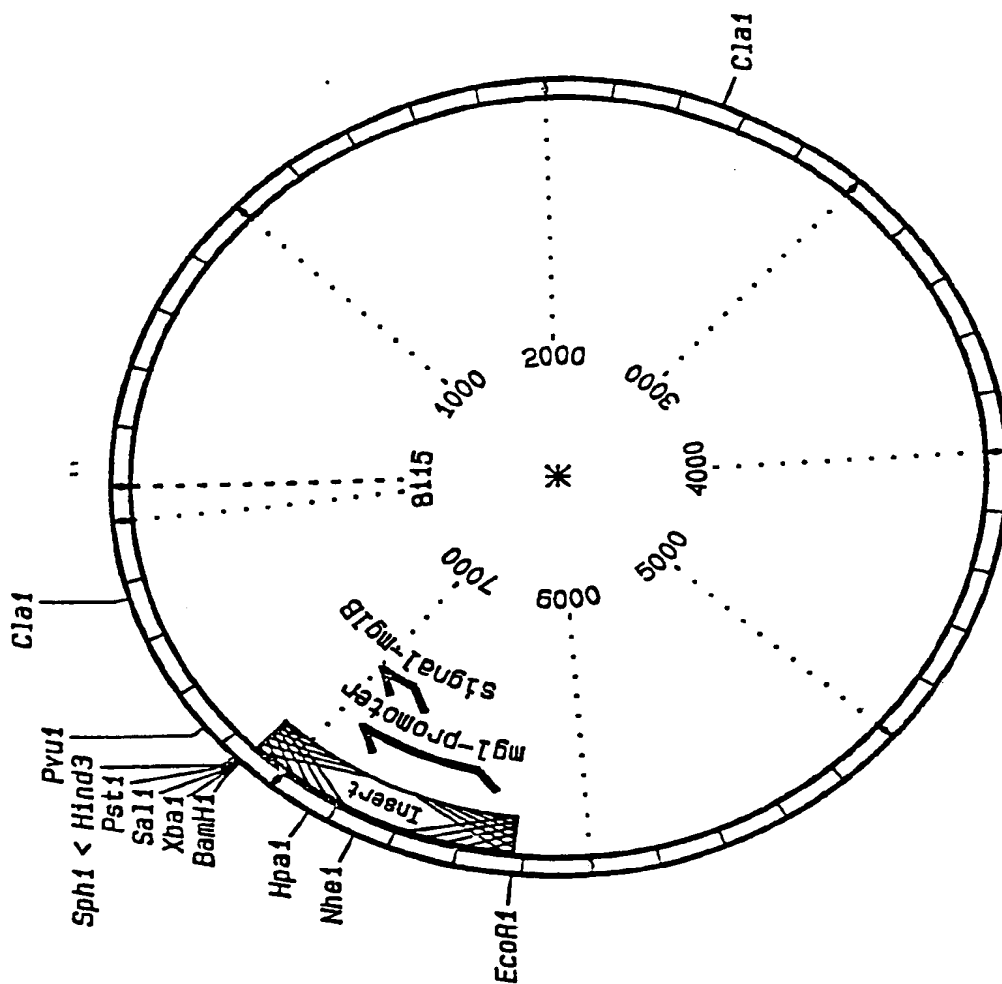
1 EcoRI
1 GAATTCCGCCGCGTTCTGAAGCGTCCGGGAGCAGAAGCCGACTATACG
61 GCAGAAGAGATTGCTCAGGCAGAGCGGCGTTTCGCCACCATGAGCGAGGAAGACAAAGCA
121 CGTCTGACCCGCAACATTATTGCCGGTTTACCTGGTACGGCGCCATTTCGGTGGCATGGCG
181 ACAGAATGCGGTACTGATCACTAACTGATTACGCACCGCATGTAACCGTTTTCAATCTGT
241 GAGTAAATTCACAGTTTATTAACATTGTGATAGCTATGATGACAACGTTTGTGCGCACTGT
301 AACTAACGTGTAACAGTTAGTTGTCAGTTTGTGCTGGGGTATTTTCGCTTATAAAAACCGTT
361 ATCACAATATCCCGCGACTACCGGACAAAAATAAAGAGTTGAATAAGAGCTTATCCCATT
421 AGGGCTATTTTACTTGCCATTTTGGACCTGGGCAGTGCTCGCCAAAACGCGTTAGCGTTT
481 TGAACGCGCTAGCGGCGGCCCGAAGGGCGAGCGTAGCGAGTCAAACCTCAGTACTACGT
541 GTACGCTCCGGTTTTTTCGCGCTGTCCGTGTCCAACTGCTGCGCCAATAACGCCTGGTG
601 GGATAGGCTCTAAATACGCTTCGGCGTTTCACTAACACGCGTTAACGTGCTGAACAGCCGG
661 GCATTTTTTTTACGCTATACCCTACATAATAAAAACCGGAGCTACC

mglB-Signalsequenz:

705 ATGAATAAGAAGGTACTGACCCTTTCTGCCGTGATGGCAAGTCTGTTATTCGGCGCGCAC
MetAsnLysLysValLeuThrLeuSerAlaValMetAlaSerLeuLeuPheGlyAlaHis
765 GCGCACGCG
AlaHisAla
774 GCTGATACTCGTTGAAGCGGCGCACGAAAAACGCGAAAGCGTTTCACGATAAATGCGAAA
834 ACTTTAGCTTTCGCGCTTCAAATGAAACAGATGTATTAATTACTGCTTTTTATTTCATTAC
894 ATGGGGATCC
BamHI

Fig. 2

Restriktionskarte von M13mg1506



3/11

Fig. 3

Restriktionskarte von pUC18 in den das EcoRI-BamHI-Fragment, welches das mgl-Promotorfragment enthält, einligiert ist.

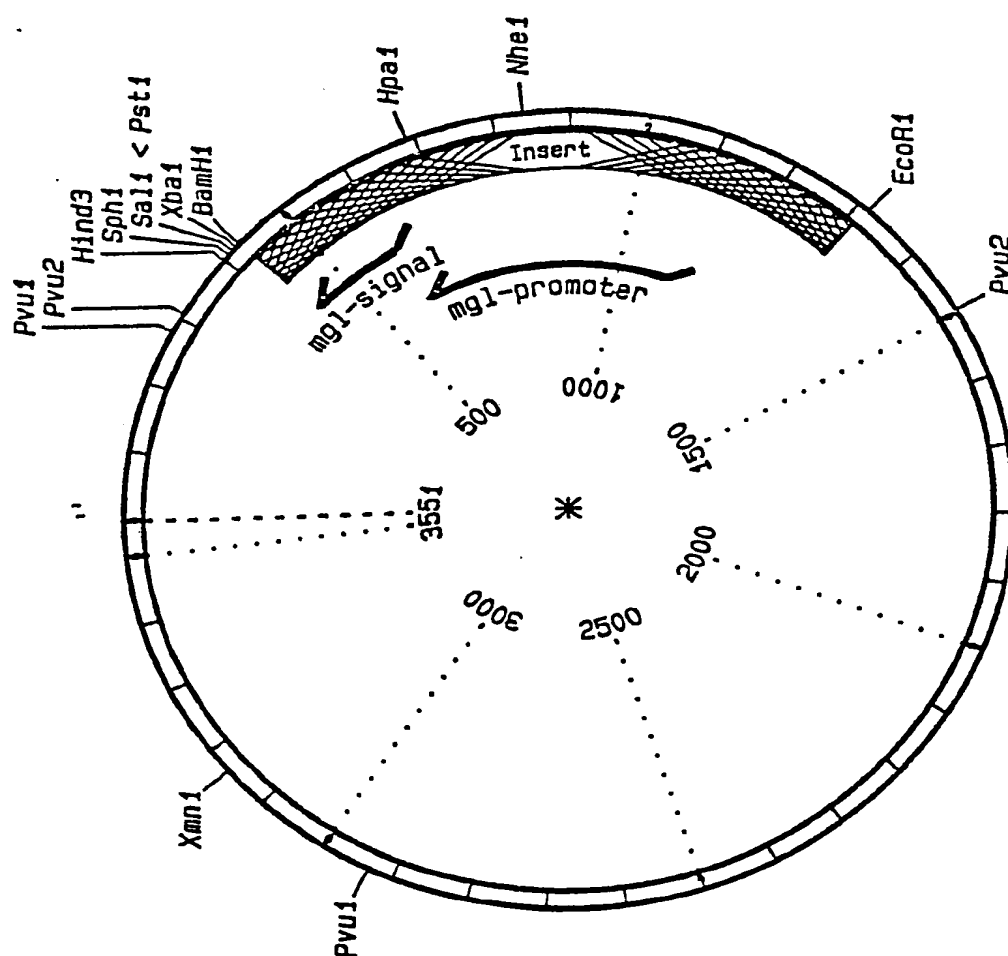
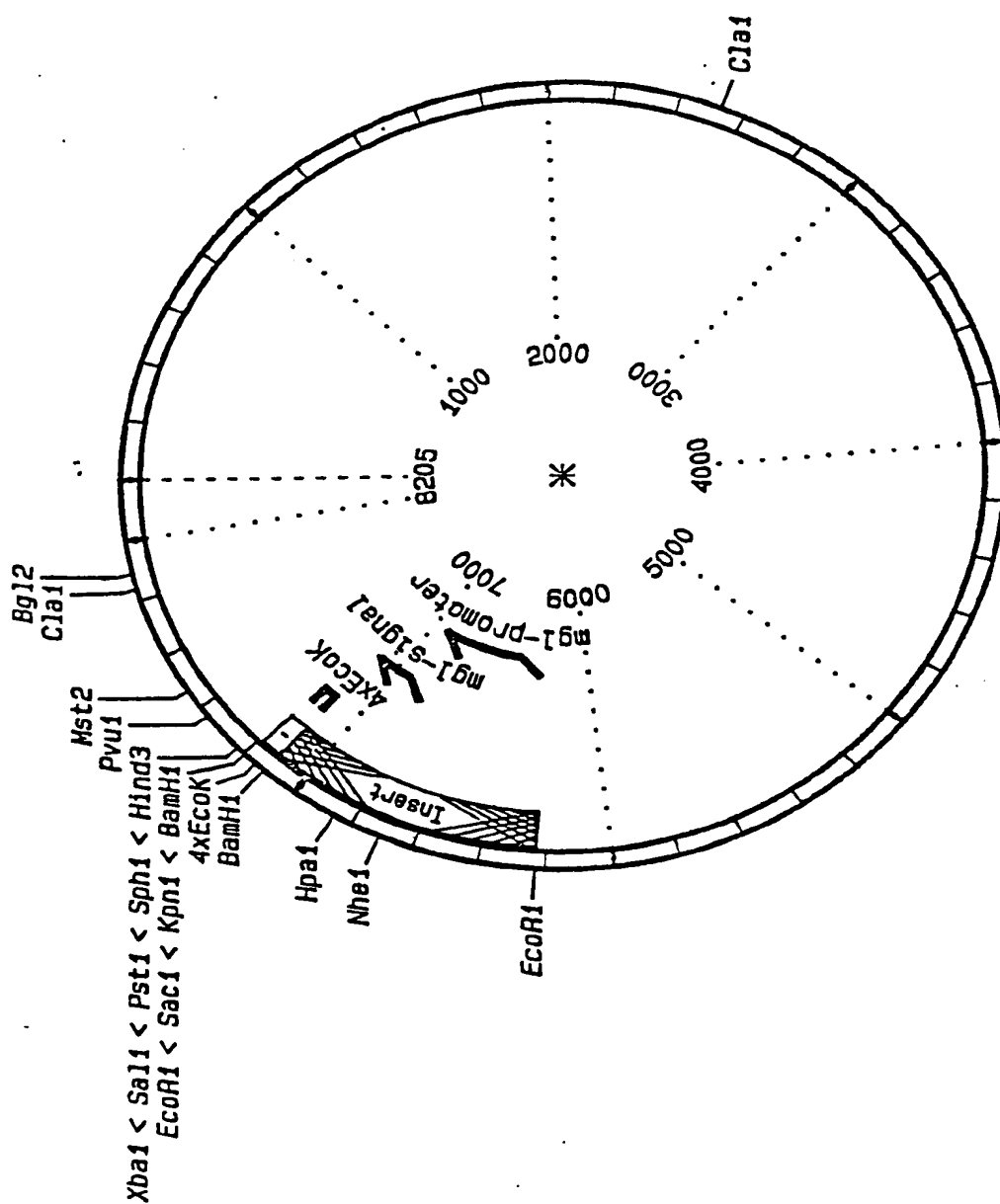


Fig. 4

Restriktionskarte von M13mg1EcoK



S/11

Fig. 5

Restriktionskarte von M13mg1506 in den die 4 x EcoK-Kassette und das EcoRI/SalI-Fragment mit dem N-terminalen Teil des Endo-H-Gens eingefügt ist.

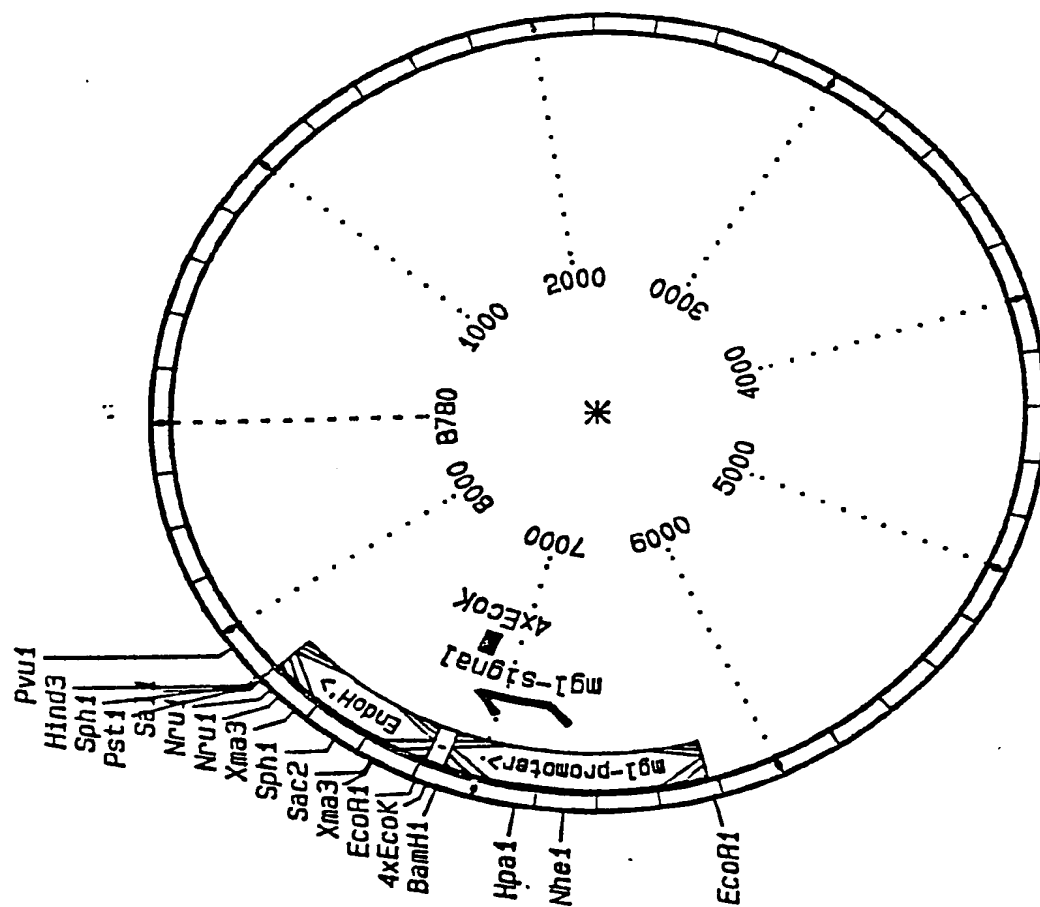


Fig. 6

Restriktionskarte von pBT 0103

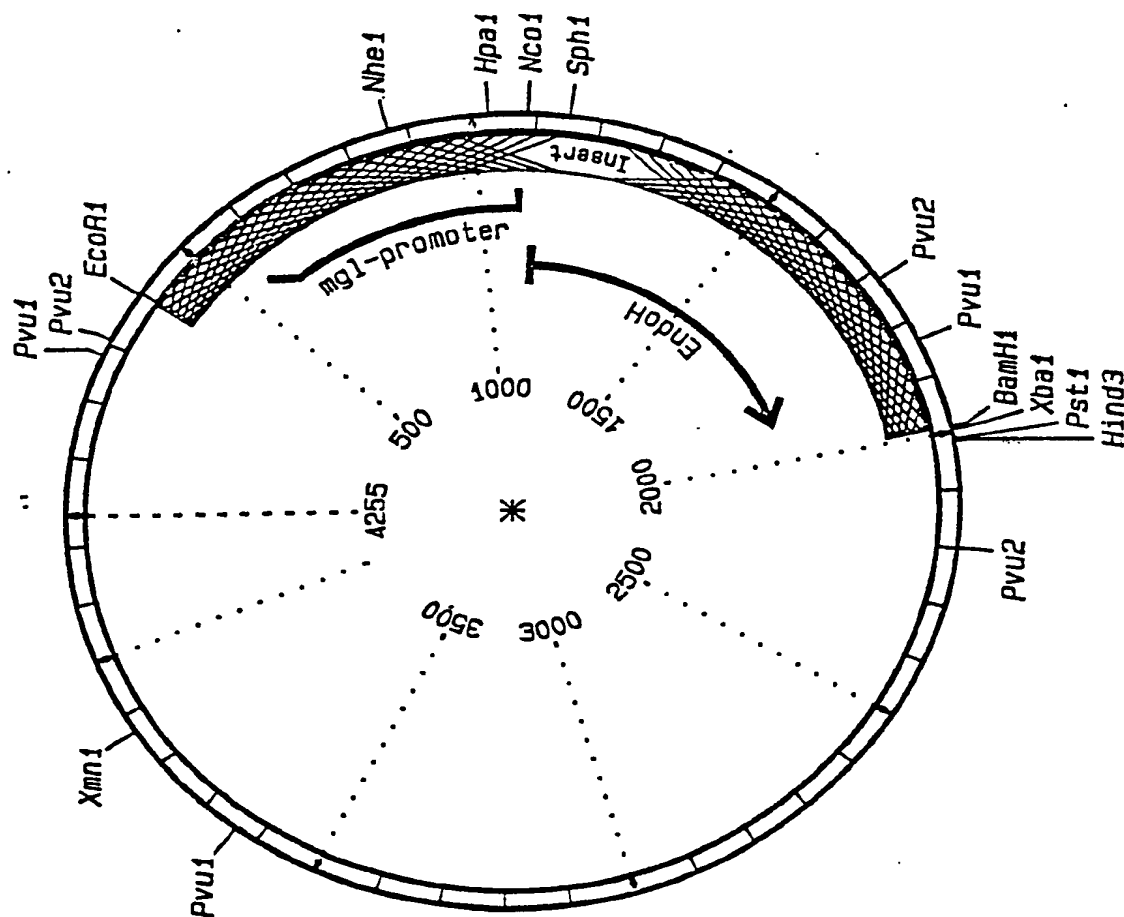


Fig. 7

Sequenz des Vektors pUC18

pUC18

1 GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
61 CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT
121 CACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
181 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCT
241 CGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCG
301 TTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC
361 ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
421 AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGT
481 GCGGTATTTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGT
541 TAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCC
601 CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTT
661 CACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGG
721 TTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGC
781 GCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
841 AATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATAGTATTCAACATT
901 TCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAG
961 AAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCG
1021 AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAA
1081 TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
1141 AAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAG
1201 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAA
1261 CCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
1321 TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
1381 AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAA
1441 CAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAA
1501 TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG
1561 GCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGCGGTCTCGCGGTATCATGTCAG
1621 CACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGG
1681 CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATT
1741 GGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTT
1801 AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAC
1861 GTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG
1921 ATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGG
1981 TGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCA
2041 GAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA
2101 ACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
2161 GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGC
2221 AGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACA
2281 CCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAA
2341 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
2401 CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
2461 GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG
2521 CCTTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCTGCTTAT
2581 CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA
2641 GCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

Fig. 8

Sequenz des Endo- β -N-acetylglucosaminidase-H-Gens

EndoH-Gen

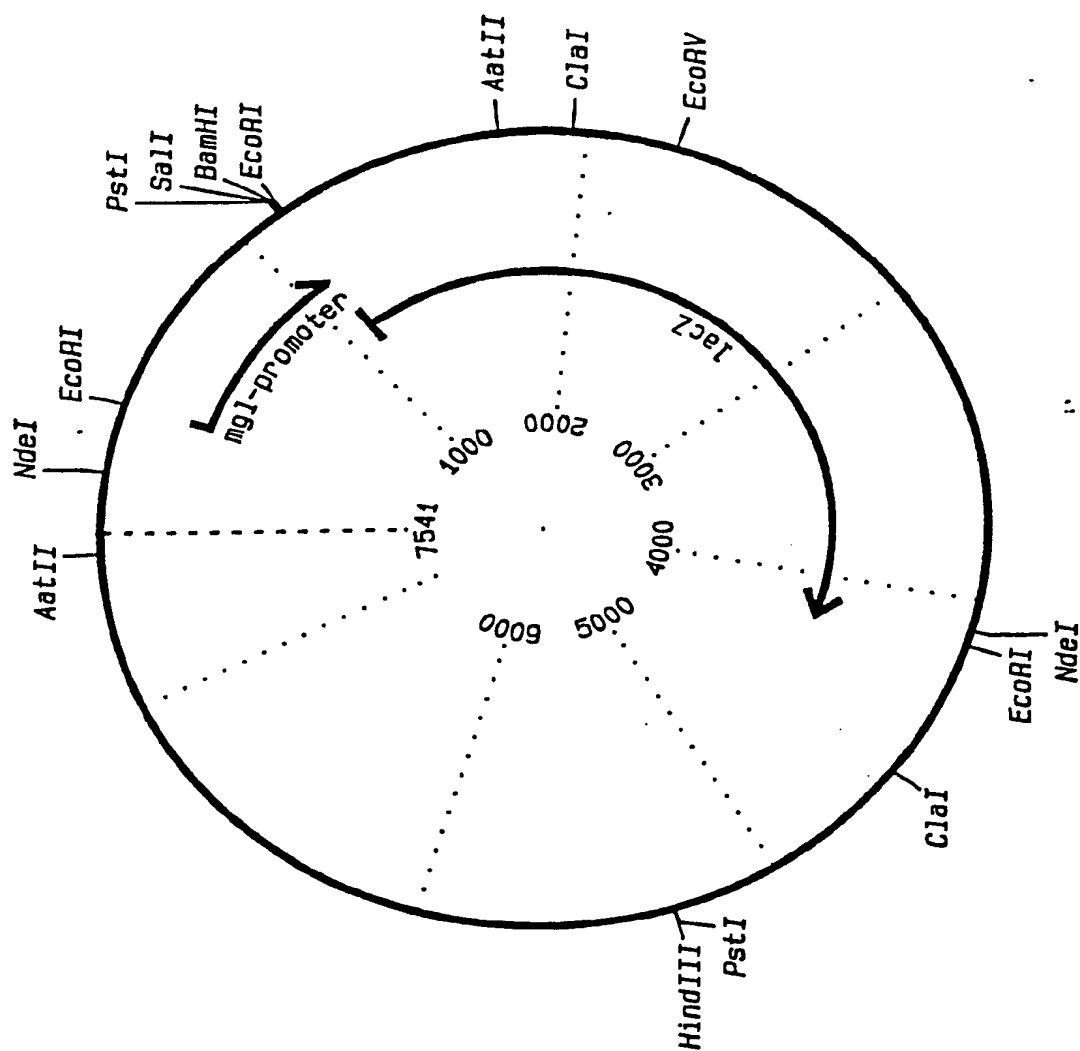
1 GAATTCCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATG
61 TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGCCATGTTCACTCCGGTTC
121 GCAGAAGGGTGCGGACGGCTGCGCTCGCGCTCTCGGCCGCCGGGCCCTCGTCCTCGGTT
181 CCACCGCCGCGAGCGGCGCGTCAGCGACCCCCTCACCCGCTCCGGCCCCGGCCCCGGCCC
241 CGGTGAAGCAGGGGCGGACCTCGGTGGCCTACGTCGAGGTGAACAACAACAGCATGCTCA
301 ACGTCGGCAAGTACACCCTGGCGGACGGAGGCGGCAACGCCTTCGACGTAGCCGTGATCT
361 TCGCGGCGAACATCAACTACGACACCGGCACGAAGACGGCCTACCTGCACTTCAACGAGA
421 ACGTGCAGCGCGTCCTTGACAACGCTGTACGCAGATACGGCCGTTGCAGCAACAGGGCA
481 TCAAGGTCCTCCTCTCGGTGCTCGGCAACCACCAGGGCGCCGGGTTGCGGAAGTTCCTCT
541 CACAGCAGGCGGCTTCGGCGTTTCGCGAAGCAGCTCTCGGACGCCGTGGCGAAGTACGGCC
601 TCGACGGCGTCGACTTCGACGACGAATACGCCGAGTACGGCAACAACGGCACCGCGCAGC
661 CCAACGACAGTTCGTTTCGTGCACCTGGTGACGGCACTGCGCGCGAACATGCCCCGACAAGA
721 TCATCAGCCTCTACAACATCGGCCCCGGCCGCGTCCCGCCTGTCGTACGGCGGTGTCGACG
781 TCTCCGACAAGTTCGACTACGCCTGGAATCCCTACTACGGCACCTGGCAGGTCCCCGGCA
841 TCGCACTGCCCAAGGCGCAGCTGTGCGCGGCGGCGGTCGAGATCGGCCGGACCTCACGGA
901 GCACCGTCGCCGACCTCGCCCGTCGCACCGTTCGACGAGGGGTACGGCGTCTATCTGACGT
1961 ACAACCTCGACGGCGGCGATCGCACCGCCGACGTCTCCGCGTTTACCAGGGAGCTGTACG
1021 GCAGCGAGGCGGTCCGGACGCCGTAGGGGCGTCGGGGCCTGCCGTAGTCCAGTACGAAG
1081 GTGCCGCCGGCGGTGGTCGCCTGGCCGTGCCCGAAAGCGGCCGCCGGCGTCCAGGATCC

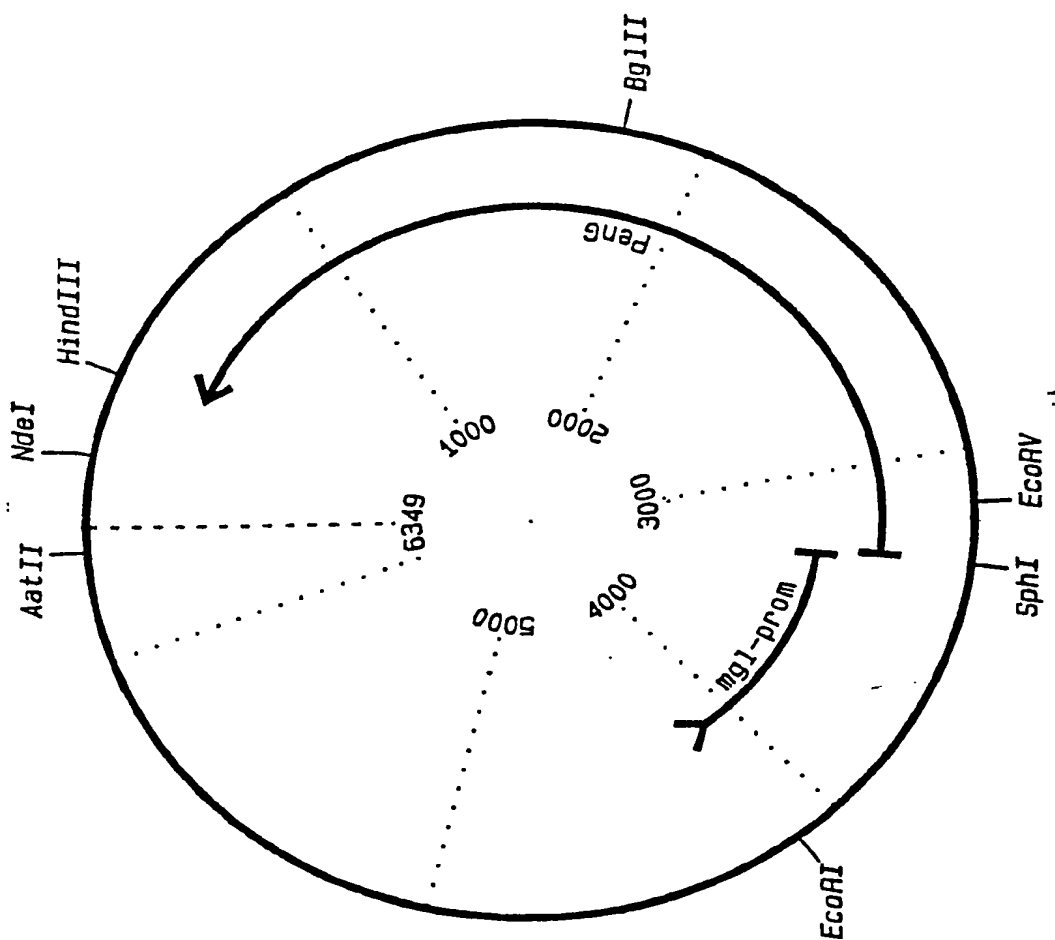
Fig. 9

Sequenz des Vektors pUC13

pUC13

```
1   GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
61  CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT
121 CACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
181 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGG
241 GCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTAC
301 AACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC
361 CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
421 GCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
481 TTTCACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCC
541 AGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCAT
601 CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTCACCGT
661 CATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATG
721 TCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
781 CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
841 CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG
901 TCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTGTGTTTTGCTCAGCCAGAAACGC
961 TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG
1021 ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
1081 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
1141 AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAG
1201 AAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
1261 GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
1321 CTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
1381 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
1441 TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
1501 GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
1561 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG
1621 GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTA
1681 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
1741 TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTAA
1801 AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT
1861 TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
1921 TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
1981 GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGC
2041 AGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTG
2101 TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
2161 ATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
2221 CGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
2281 TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
2341 ACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
2401 GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT
2461 TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTT
2521 TACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTG
2581 ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
2641 CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
```





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 88/00446

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 12 N; C 12 P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Journal of Bacteriology, vol. 163, No. 1, July 1985, American Society for Microbiology, N. Müller et al.: "Characterization of the Salmonella typhimurium mgl operon and its gene products", pages 37-45 see the whole document	1-3,6,7,9,10, 13-15,18,19, 23-25
Y	---	3-5,16,17,21, 26
P,X	Mol. Gen. Genet. vol. 208, 1987, published by Springer, A. Scholle et al.: "Sequence of the mglB gene from Escherichia coli K12: comparison of wild-type and mutant galactose chemoreceptors", pages 247-253 see page 249, left hand column, lines 7-39; figs. 2,3; page 250, right hand column, line 4 - page 252, left hand column line 7	1-3,6,7,9,10, 13-15,18,19, 23-26
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol. 258, 25 September 1983, (US), J. Benjamin Scripture et al.: "The nucleotide sequences defining the signal peptides of the galactose-binding protein and the arabinose-binding protein", pages 10853-10855 see page 10854, right hand column, lines 22-50; fig. 3	6,7,18,19,24, 25
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
26 August 1988 (26.08.88)	11 October 1988 (11.10.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	EP, A, 0141362 (TAMURA) 15 May 1985 see page 3, line 36 - page 4, line 13; page 4, line 23 - page 5, line 15	3,5-7,18,19, 24,25
Y	Gene, vol. 51, Nos. 2-3, 1987, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), M.J.R. Stark: "Multicopy expression vectors carrying the Lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in Escherichia coli", pages 255-267 see the whole document	5,16,17
Y	EP, A, 0215388 (AJINOMOTO) 25 March 1987 see column 10, lines 11-25; column 15, lines 7-22	4,5,17
Y	US, A, 4595658 (ZINDER) 17 June 1986 see column 4, lines 49-68; column 7, lines 1-18	26
Y	EP, A, 0137633 (ZYMOGENETICS) 17 April 1985 see page 3, line 25 - page 6, line 30	3,16,21
A	EP, A, 0035384 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 September 1981 see page 28, line 30 - page 29, line 6	8
A	EP, A, 0177343 (GENENTECH) 9 April 1986 see page 13, lines 24-27; page 15, lines 18-32	1-26
A	WO, A, 86/04356 (INTERNATIONAL GENETIC ENGINEERING) 31 July 1986 see page 27, lines 1-7	1-26
A	Chemical Abstracts, vol. 95, 1981, (Columbus, Ohio, US), K. Ito et al.: "Protein localization in E. coli: is there a common step in the secretion of periplasmic and outer membrane proteins?", see page 333, abstract 57836t, & Cell (Cambridge, Mass.) 1981; 24(3), 707-17	1-26
A	Journal of Bacteriology, vol. 153, No. 1 January 1983, American Society for Microbiology S. Harayama et al.: "Characterization of the mgl operon of Escherichia coli by transposon mutagenesis and molecular cloning", pages 408-415 see the whole document (cited in the application)	1-26
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 257, No. 15, 10 August 1982, (US), B. Rotman et al.: "Identification of the mglA gene product in the β -methylgalactoside transport system of Escherichia coli using plasmid DNA deletions generated in Vitro", pages 9030-9034 see page 9033, lines 46-49	1-26
A	WO, A, 84/04755 (BATTELLE INSTITUT) 6 December 1984 see the whole document	1-26

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 8800446

SA 22180

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 29/09/88
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0141362	15-05-85	JP-A- 60091984	23-05-85
EP-A- 0215388	25-03-87	JP-A- 62151184	06-07-87
US-A- 4595658	17-06-86	Keine	
EP-A- 0137633	17-04-85	AU-A- 3180184	14-02-85
		JP-A- 60186290	21-09-85
EP-A- 0035384	09-09-81	JP-A- 56166200	21-12-81
		AU-A- 6792281	03-09-81
		AU-B- 545394	11-07-85
		CA-A- 1200773	18-02-86
		CA-C- 1200774	18-02-86
		CA-C- 1200775	18-02-86
		CA-C- 1201075	25-02-86
EP-A- 0177343	09-04-86	JP-T- 62500554	05-03-87
		US-A- 4680262	14-07-87
		JP-A- 61092575	10-05-86
WO-A- 8604356	31-07-86	EP-A- 0211047	25-02-87
		JP-T- 62501538	25-06-87
WO-A- 8404755	06-12-84	DE-A- 3319242	29-11-84
		EP-A- 0146572	03-07-85
		JP-T- 60501439	05-09-85

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 88/00446

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4. C 12 N 15/00; C 12 P 21/00						
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Recherchierter Mindestprüfstoff⁷ Klassifikationssymbole </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl. 4</td> <td style="padding: 5px;">C 12 N; C 12 P</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</p>			Klassifikationssystem		Int. Cl. 4	C 12 N; C 12 P
Klassifikationssystem						
Int. Cl. 4	C 12 N; C 12 P					
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹						
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³				
X	Journal of Bacteriology, Band 163, Nr. 1, Juli 1985, American Society for Microbiology, N. Müller et al.: "Characterization of the Salmonella typhimurium mgl operon and its gene products", Seiten 37-45 siehe das ganze Dokument	1-3, 6, 7, 9, 10, 13-15, 18, 19, 23-25				
Y		3-5, 16, 17, 21, 26				
P, X	-- Mol. Gen. Genet. Band 208, 1987, Springer-Verlag, A. Scholle et al.: "Sequence of the mglB gene from Escherichia coli K12: comparison of wild-type and mutant galactose chemoreceptors", Seiten 247-253 siehe Seite 249, linke Spalte, Zeilen 7-39; Abbildungen 2, 3; Seite 250, rechte Spalte, Zeile 4 - Seite 252, linke Spalte ./.	1-3, 6, 7, 9, 10, 13-15, 18, 19, 23-26				
<div style="display: flex;"> <div style="width: 50%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>						
IV. BESCHEINIGUNG						
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 26. August 1988		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: large;">11 OCT 1988</div>				
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right;"> P.C.G. VAN DER PUTTEN </div>				

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	Zeile 7	
Y	-- The Journal of Biological Chemistry, Band 258, 25. September 1983, (US), J. Benjamin Scripture et al.: "The nucleotide sequences defining the signal peptides of the galactose-binding protein and the arabinose-binding protein", Seiten 10853-10855 siehe Seite 10854, rechte Spalte, Zeilen 22-50; Abbildung 3	6,7,18,19, 24,25
Y	-- EP, A, 0141362 (TAMURA) 15. Mai 1985 siehe Seite 3, Zeile 36 - Seite 4, Zeile 13; Seite 4, Zeile 23 - Seite 5, Zeile 15	3,5-7,18, 19,24,25
Y	-- Gene, Band 51, Nrn. 2-3, 1987, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), (Amsterdam, NL), M.J.R. Stark: "Multicopy expression vectors carrying the Lac repressor gene for re- gulated high-level expression of genes in Escherichia coli", Seiten 255-267 siehe das ganze Dokument	5,16,17
Y	-- EP, A, 0215388 (AJINOMOTO) 25. März 1987 siehe Spalte 10, Zeilen 11-25; Spalte 15, Zeilen 7-22	4,5,17
Y	-- US, A, 4595658 (ZINDER) 17. Juni 1986 siehe Spalte 4, Zeilen 49-68; Spalte 7, Zeilen 1-18	26
Y	-- EP, A, 0137633 (ZYMOGENETICS) 17. April 1985 siehe Seite 3, Zeile 25 - Seite 6, Zeile 30	3,16,21
A	-- EP, A, 0035384 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9. September 1981 siehe Seite 28, Zeile 30 - Seite 29, Zeile 6	8
A	-- EP, A, 0177343 (GENENTECH) 9. April 1986 siehe Seite 13, Zeilen 24-27; Seite 15, Zeilen 18-32	1-26
A	-- WO, A, 86/04356 (INTERNATIONAL GENETIC ENGINEERING) 31. Juli 1986 siehe Seite 27, Zeilen 1-7	1-26
A	-- Chemical Abstracts, Band 95, 1981, (Columbus, Ohio, US), K. Ito et al.: "Protein localization in E. coli: is there a common step in the secretion of periplasmic and outer membrane proteins?", siehe Seite 333, Zusammenfassung	1-26 ./.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	57836t, & Cell (Cambridge, Mass.) 1981, 24(3), 707-17 --	
A	Journal of Bacteriology, Band 153, Nr. 1 Januar 1983, American Society for Micro- biology, S. Harayama et al.: "Characterization of the mgl operon of Escherichia coli by transposon mutagenesis and molecular cloning", Seiten 408-415 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1-26
A	The Journal of Biological Chemistry, Band 257, Nr. 15, 10. August 1982, (US), B. Rotman et al.: "Identification of the mglA gene product in the β -methylgalac- toside transport system of Escherichia coli using plasmid DNA deletions generated in Vitro", Seiten 9030-9034 siehe Seite 9033, Zeilen 46-49 --	1-26
A	WO, A, 84/04755 (BATTELLE INSTITUT) 6. Dezember 1984 siehe das ganze Dokument -----	1-26

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 8800446
SA 22180

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 29/09/88
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0141362	15-05-85	JP-A- 60091984	23-05-85
EP-A- 0215388	25-03-87	JP-A- 62151184	06-07-87
US-A- 4595658	17-06-86	Keine	
EP-A- 0137633	17-04-85	AU-A- 3180184	14-02-85
		JP-A- 60186290	21-09-85
EP-A- 0035384	09-09-81	JP-A- 56166200	21-12-81
		AU-A- 6792281	03-09-81
		AU-B- 545394	11-07-85
		CA-A- 1200773	18-02-86
		CA-C- 1200774	18-02-86
		CA-C- 1200775	18-02-86
		CA-C- 1201075	25-02-86
EP-A- 0177343	09-04-86	JP-T- 62500554	05-03-87
		US-A- 4680262	14-07-87
		JP-A- 61092575	10-05-86
WO-A- 8604356	31-07-86	EP-A- 0211047	25-02-87
		JP-T- 62501538	25-06-87
WO-A- 8404755	06-12-84	DE-A- 3319242	29-11-84
		EP-A- 0146572	03-07-85
		JP-T- 60501439	05-09-85

EPD FORM P0473